

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660095

研究課題名(和文) ビオチンの新規機能 - 性ホルモン産生促進作用 - の機構解析

研究課題名(英文) Novel function of biotin on testosterone production

研究代表者

白川 仁 (Hitoshi, Shirakawa)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40206280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビオチンは哺乳類において4種のカルボキシラーゼの補酵素として働き、糖質、脂質、アミノ酸代謝と密接に関連している。一方、我々はビオチンが黄体形成ホルモン非依存的にテストステロン産生を上昇させることを発見した。本研究では、細胞内のサイクリックヌクレオチド量を調節する酵素群に焦点を当て、ビオチンのこの新しい作用を解析した。精巣由来腫瘍細胞をビオチンで処理すると、テストステロン産生量が上昇したが、アデニル酸シクラーゼに対する阻害剤の処理によって、ビオチンの効果は消失した。このことから、ビオチンによるテストステロン産生上昇はアデニル酸シクラーゼの活性化によると推定された。

研究成果の概要(英文)：Biotin, a water soluble vitamin, is essential for four types of carboxylases involved in metabolism of carbohydrate, lipid and amino acids in mammals. We previously explored novel functions of biotin by transcriptome analysis and found that biotin could increase testosterone levels in testis of rats without the enhancement of luteinizing hormone. Here we analyzed the detailed mechanism of enhancement of steroidogenesis by biotin in mouse testis-derived tumor cells. I-10 cells were treated with biotin and the levels of testosterone in cultured medium were measured by ELISA. Biotin significantly increased testosterone levels in time- and dose-dependent manners. This enhancement was abolished by the treatment of inhibitors of adenylate cyclase and protein kinase A. These results indicated that biotin stimulates adenylate cyclase in testis derived tumor cells.

研究分野：栄養化学

キーワード：ビオチン

### 1. 研究開始当初の背景

水溶性ビタミンのビオチンは、哺乳動物において4種類のカルボキシラーゼの補酵素として、重炭酸塩をカルボキシル基として基質に転移させる反応に参与している。一方、この機能以外のビオチンの作用が我々の研究を含めて報告されている。即ち、ビオチンは、グルコース応答性のインスリン分泌を増強すること、糖新生を遺伝子レベルで抑制すること、抗炎症作用を有すること、血圧上昇を抑制すること、筋肉におけるインスリン依存の糖取り込みを促進することなどが示されている。これらの作用の一部は、ビオチンによるグアニル酸シクラーゼの活性化と、それに続くcGMPの上昇、cGMP経路の活性化により、起こるとされている。一方、我々は、最近、ビオチンを投与した雄ラットの網羅的な解析から、ビオチンがテストステロン産生を上昇させること、また、精巣由来培養細胞を用いた解析から、ビオチンの処理により濃度依存的にテストステロン産生が上昇することを見出した。精巣におけるテストステロン産生には、cAMP経路の活性化が必要であることから、ビオチンが本経路に関わると推定された。この新知見と、従来から報告のあるcGMP量の増加を合わせ考えると、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの阻害が鍵であると考えられた。

### 2. 研究の目的

ビオチンによる性ホルモン産生促進機構の解析を通じて、ビオチンの新しい作用を明らかにすることを目的とした。特に、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの阻害活性に焦点をあてた。本研究結果は、これまで作用機序が不明であった一部のビオチンの作用の解明につなげることができる。

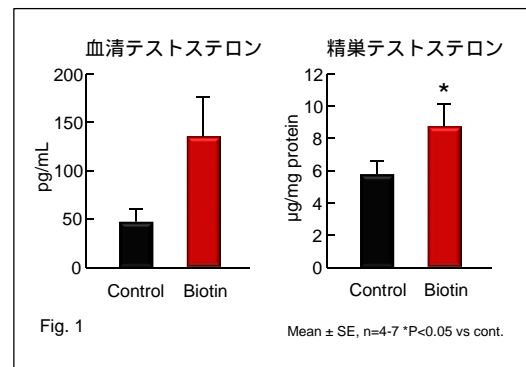
### 3. 研究の方法

BALB/c マウス (雄: 7 週齢) にビオチンを腹腔内投与し、血清および精巣中のテストステロン量を ELISA 法で測定した。また、血清中の黄体形成ホルモン濃度を ELISA 法で測定した。マウス精巣由来癌細胞である I-10 細胞をビオチン存在下・非存在下で一定時間培養し、培地中に分泌されたテストステロンおよびプロゲステロン量を ELISA 法により測定した。次に、ビオチンの作用点を推定するため、テストステロン合成経路の上流因子に当たるアデニル酸シクラーゼやホスホジエステラーゼ、A キナーゼの阻害剤で処理した場合のテストステロン量を測定した。また、A キナーゼの活性化について、cAMP 応答配列をプロモーターに有するレポーター遺伝子を I-10 細胞にトランスフェクションし、レ

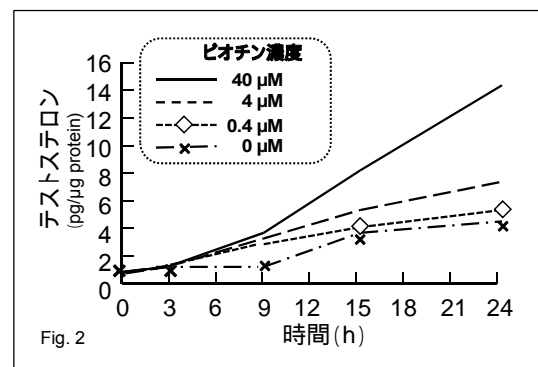
ポーター遺伝子活性を調べた。ビオチン構造類似体である D-デスチオビオチン、 $\alpha$ -リボ酸、n-バレリアン酸を用いてテストステロン分泌量の変化を調べた。

### 4. 研究成果

マウスにビオチン溶液を腹腔内投与したところ、投与後 6 時間の血清中及び精巣中のテストステロン濃度が有意に上昇した (Fig. 1)。血清黄体形成ホルモン濃度はビオチン投与により変化しなかったことから、ビオチンは黄体形成ホルモン非依存的に精巣におけるテストステロン産生を上昇させることが明らかになった。



I-10 細胞をビオチンで処理した場合、40  $\mu$ M まで添加量依存的、24 時間まで培養時間依存的に、培地中のテストステロン量がコントロールに比べ増加し、ビオチンがテストステロン産生量を上昇させることが確認された (Fig. 2)。また、テストステロンの中間体であるプロゲステロンの分泌量についても、テストステロンと同様に添加量・培養時間依存的に増加していた。



次に、このステロイド産生上昇に cAMP-A キナーゼ経路が関与しているかどうかについて解析を行った。A キナーゼの阻害剤で処理した場合、ビオチンによるテストステロン産生上昇は阻害された。また、cAMP 応答配列を有するレポーター遺伝子は、ビオチン処理により有意に上昇した。ビオチン処理後の細胞内 cAMP 量を測定したところ、有意に上昇

していた。以上のことから、ビオチンは細胞内 cAMP 量を上昇させ、テストステロン産生量を上昇させると推定された。この cAMP 量の上昇はアデニル酸シクラーゼの活性化、またはサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼの阻害によると考えられたことから、両酵素の阻害剤を用いて解析を行ったところ、アデニル酸シクラーゼ阻害剤でビオチンによるテストステロン上昇が消失した。さらに、ビオチンの構造類縁体である、D-デスチオビオチンによっても、テストステロン産生上昇が見られた。以上のことから、ビオチンはテストステロン産生を促進し、その作用は、アデニル酸シクラーゼの活性化を介した cAMP/A キナーゼ経路の活性化を介することが明らかとなった。また、ビオチンと D-デスチオビオチンと共通の構造がテストステロン産生促進作用を示すことが示唆された。

ビオチンが cAMP、cGMP 量を増加させる機構が両方の調節因子であるサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ阻害のよると仮説を立て研究を行ったが、ビオチンにはエステラーゼ阻害活性は無く、両サイクリックヌクレオチド合成酵素を活性化することが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

前田美里、白川仁、駒井三千夫 消化管特異的 Slc5a6 遺伝子欠損によるビオチンの吸収阻害 ビタミン、2014、88 巻、96-97、査読有

前田美里、白川仁、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビオチンが I-10 細胞のテストステロン産生に及ぼす影響とその作用機序 無菌生物 2014、44 巻、121-123、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Hitoshi Shirakawa, Misato Maeda, Hsin-Jung Ho, Tomoko Katsurai, Tomoko Goto, Michio Komai Effect of biotin on steroidogenesis in cultured testis-derived tumor cells. Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 16 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

前田美里、白川仁、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビオチンがテストステロン産生に及ぼす影響とその作用機序の解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 29 日 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

前田美里、白川仁、桂井朋子、駒井三千夫

ビオチンのテストステロン産生促進作用と I-10 細胞における作用機序解析 日本ビタミン学会第 66 回大会 2014 年 6 月 13 日 姫路商工会議所(兵庫県・姫路市)

前田美里、白川仁、桂井朋子、駒井三千夫 ビオチンが I-10 細胞のテストステロン産生に及ぼす影響とその作用機序 第 47 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会 2014 年 1 月 31 日アルカディア市ヶ谷(東京都・千代田区)

前田美里、白川仁、桂井朋子、駒井三千夫 ビオチンは精巣由来ライディッヒ細胞においてテストステロン産生を促進する 日本ビタミン学会第 65 回大会 2013 年 5 月 17 日、一橋大学一橋講堂(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

白川仁 第 7 章 ビタミンの栄養 163 (107 - 122) 基礎栄養学 駒井三千夫、正木恭介 編 アイ・ケイコーポレーション (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 仁 (SHIRAKAWA, Hitoshi)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 40206280

(2) 研究分担者

後藤 知子 (GOTO, Tomoko)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：00342783

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：